Ewelina Łakomiec

Struktury i właściwości immunochemiczne oligosacharydów endotoksyn bakteryjnych i ich zastosowanie w szczepionkach neoglikokoniugatowych

Streszczenie

Szczepionki glikokoniugatowe łączą w sobie właściwości antygenowe składników cukrowych i białkowych. Obecność białka zwiększa skuteczność składnika cukrowego w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej. Zaletą szczepionek koniugatowych jest bezpieczeństwo, wynikające z dokładnej charakterystyki antygenów. Badania, opisane w niniejszej pracy, koncentrowały się na ocenie właściwości immunogennych oligosacharydów rdzenia pochodzących z bakterii Gram-ujemnych oraz toksoidów otrzymanych na bazie toksyn bakterii Gram-dodatnich. Otrzymane glikokoniugaty, zaprojektowano tak, aby były bezpieczne w stosowaniu oraz skutecznie indukowały wytwarzanie przeciwciał ochronnych przeciwko możliwie szerokiemu spektrum bakterii. Metody analityczne wykorzystane do charakterystyki strukturalnej antygenów cukrowych i białkowych oraz glikokoniugatów obejmowały spektrometrię mas (MS) i spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Oligosacharydy rdzenia (R1 i R1Z) pochodzące z lipooligosacharydu (LOS) typu R1 bakterii *Escherichia coli*, zostały wyizolowane z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) na kolumnie ZIC®-HILIC. Połączenie chromatografii cieczowej i spektrometru masowego ze źródłem jonów typu elektrorozpylanie, umożliwiało bezpośrednią analizę zawartości eluentu i izolację oligocukrów na podstawie niewielkich różnic w budowie. Pierwszy użyty nośnik białkowy (TBd), zwierał C-końcowy fragment domeny receptorowej toksyny B z bakterii *Clostridium difficile*, który nie wykazuje właściwości cytotoksycznych. Białko TBd zostało wybrane i zaprojektowane jako potencjalny składnik szczepionki przeciw *C. difficile*, a jednocześnie jako białko nośnikowe w glikokoniugacie. Drugim białkiem nośnikowym był, często używany w szczepionkach koniugatowych, toksoid tężcowy (TTd). Oligosacharydy skoniugowano z nośnikami (TBd i TTd), a otrzymane glikokoniugaty, scharakteryzowane z wykorzystaniem technik immunoblottingu i MS, posłużyły do immunizacji królików.

Surowice pobrane od immunizowanych królików, które najsilniej reagowały z LOS typu R1, przebadano z lipopolisacharydami (LPS) wyizolowanymi z 33 wybranych bakterii Gram-ujemnych. Przeciwciała wykazały silną reakcję krzyżową z LOS lub LPS zawierającymi oligosacharydy rdzenia identyczne lub bardzo podobne do oligosacharydu typu R1. Dodatkowo, w surowicach anty-R1Z stwierdzono obecność przeciwciał reagujących z LPS bakterii *Bordetella pertussis* 186 i *Klebsiella pneumoniae* O3 oraz O5. Wiązanie przeciwciał obecnych w surowicy z antygenami występującymi na powierzchni nienaruszonych szorstkich i gładkich bakterii Gram-ujemnych *E. coli* R1, O18 i O39, *Klebsiella pneumoniae* O3 i O5 i *Bordetella pertussis* 186 zostało potwierdzone za pomocą technik cytometrii przepływowej. Surowice wykazywały również aktywność bakteriobójczą wobec wyżej wymienionych szczepów.

Analiza STD NMR oligosacharydów R1, R1Z i *B. pertussis* 186 wykazała epitopy odpowiedzialne za oddziaływanie z immunoglobulinami G wyizolowanymi z badanych surowic. W przypadku oligosacharydów wyizolowanych z *E. coli*, były to głównie reszty cukrowe znajdujące się w rdzeniu zewnętrznym. Przy czym nie zaobserwowano różnic dla dwóch badanych glikoform. Analiza antygenu, pochodzącego z *B. pertussis* ujawniała, że dystalny trisacharyd jest odpowiedzialny za silne oddziaływanie z przeciwciałem.